

Effects of the lysosomal fraction of polymorphonuclear leukocytes on proliferation of cultured vascular cells

著者	笹原 正清
発行年	1987-03-24
その他の言語のタイトル	好中球リソソーム画分の血管壁由来培養細胞の増生に及ぼす影響 コウチュウキュウ リソソーム カクブン ノ ケツカンヘキ ユライ バイヨウ サイボウ ノ ゾウセイ ニオヨボス エイキョウ
URL	http://hdl.handle.net/10422/1625

氏名・(本籍) ささ はら まさ きよ 笹原正清 (滋賀県)

学位の種類 医学博士

学位記番号 論医博第17号

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位授与年月日 昭和62年3月24日

学位論文題目 Effects of the lysosomal fraction of
polymorphonuclear leukocytes on proliferation
of cultured vascular cells
(好中球リソソーム画分の血管壁由来培養細胞の増生に及ぼす影響)

審査委員 主査 教授 竹岡 成
副査 教授 挟間 章 忠
副査 教授 野崎 光 洋

論文内容の要旨

〔目的〕

好中球からの抽出物が、傷害された角膜の血管新生を促進させることや、好中球リソソーム画分(PLF)が皮膚の創傷治癒における線維芽細胞の増生を開始させることが報告されている。種々の疾患における好中球浸潤を伴う血管病変が、結果的に内膜肥厚を来たすことが知られており、血管病変における増殖性変化に好中球が重要な役割を果たす可能性が考えられる。しかし、好中球が平滑筋細胞の増生に及ぼす影響についての研究はなく、内皮細胞の増生に及ぼす影響についての研究も不十分である。本研究の目的は、PLFが培養平滑筋細胞(SMC)および内皮細胞(EC)の増生に及ぼす影響を調べることにより、種々の血管病変の増殖性変化に対するPLFの役割を明らかにしようとするものである。

〔方法〕

1) PLF: CohnとHirschの方法に従い、ラット腹腔内ヘグリコーゲンを注入し、その腹水中より好中球を得た。これよりChodirker法に従い、PLFを分離した。2) 細胞培養: SMCはラット大動脈中膜より分離培養し、4-6代にて使用した。ECはAmerican type culture collectionより購入し、20-24代にて使用した。培養液はいずれも10%牛胎児血清(FBS)を含むminimum essential mediumを用い、5%CO₂、37°Cの湿室にて培養した。3) DNAの合成の定量: 種々の細胞密度にて培養されたそれぞれの細胞に、種々の濃度(培養液1ml当り0.5μg~5.0μg)のPLFと培養液1ml当り0.5μCiのトリチウムチミジン(3H-TdR)を投与し、Rokosovaらの方法に従い、DNA当りの3H-TdRの取込み量を測定した。4) 細胞数の定量: PLFを含む培養液にて培養した細胞を、経時的

に Microcell counter (Sysmex CC 110) を用いて計数し、非投与対照群と比較した。

〔結 果〕

1. DNA合成の計測：a) PLFはSMCに対し、細胞数の多少に関わらずPLF投与量依存性のDNA合成促進を示した。DNA合成促進作用は、細胞数の少ない時にはPLF投与後、即時に出現するが、細胞数の多い時には一定時間後に明らかとなった。b) PLFはECに対し、細胞数の少ない場合にのみPLF投与量依存性のDNA合成促進を示した。DNA合成促進はPLF投与後即時に明らかとなった。ECがconfluentの状態ではDNA合成促進は見られず、抑制傾向が観察された。
2. 細胞数増加の計測：a) PLFはSMCに対し、培養早期では細胞数増加促進作用を示さなかったが、経時的な細胞増加と共に明らかな増加促進作用を示した。b) PLFはECに対して、PLFを3日毎に投与した群において、培養早期においてのみ増加促進傾向を示したが、非投与対照群との間に細胞数の有意な差は認められなかった。他方、少量のPLFを連日投与した群では、培養早期に細胞数の有意な増加促進を認めた。促進量は経時的細胞数の増加に伴い減少した。最終的には、3日毎にPLFを投与した群、連日PLFを投与した群、および非投与対照群の間には細胞数の有意な差は認められなかった。

〔考 案〕

本研究において、PLFは培養SMCおよびECのDNA合成および細胞数の増加を促進した。また、一定条件下で、DNA合成促進量とPLF投与量の間に正の相関が認められた。これらのことより、PLFはこれら細胞に対し増殖促進作用を持つことが明らかとなった。

PLFには種々の蛋白分解酵素が含まれているが、蛋白分解酵素には増殖促進作用のあることが知られている。本実験は強い蛋白分解酵素阻害作用を持つ10% FBS存在下で行われたことより、PLFの増殖促進作用は蛋白分解酵素に基づくものではないと考えられる。

本実験では、少量のPLFが10% FBSに含まれる血小板由来増殖因子存在下で活発に増殖している細胞の増生をさらに促進した。PLFの増殖促進作用は強力なものであると考えられる。

PLFのSMCに対するDNA合成促進作用は細胞数の多少により効果の現れる時間が異なっていた。細胞の増殖のサイクルとの関連も含めて、増殖因子の作用機序を明らかにする必要があると考えられる。

PLFはECがconfluentの状態では増殖促進作用を示さなかった。これは、線維芽細胞増殖因子等の他の増殖因子のECに対する作用と同様である。

SMCとECではPLFに対する反応様式は異なっていた。両細胞の持つ生物学的特性の差異によるものと考えられる。

PLFのSMCおよびECに対する増殖促進作用はある種の血管炎に伴う内膜肥厚を説明するものであり、また、動脈硬化症の一つの発症要因となるものかもしれない。

〔結 語〕

好中球リソソーム画分には、ある条件下で血管平滑筋細胞および内皮細胞の増殖を促進する作用があることがわかった。この作用は多数の好中球浸潤の見られるある種の血管炎に伴う内膜肥厚を説明するものであり、また、動脈硬化症の一つの発症要因となる可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

好中球ことにそのリソソーム画分（PLF）には創傷治癒の際に線維芽細胞および毛細血管の増殖を促進する作用のあることが知られており、種々の血管病変における血管壁ことに中膜筋細胞の増殖にも好中球が関係している可能性が考えられる。

本研究は血管中膜筋細胞および内皮細胞由来の培養細胞を用い、*in vitro* でPLFのこれら細胞に対する増殖作用を検索することにより、血管の増殖性変化における好中球の役割を明らかにしようとしたものである。

本研究ではラット大動脈中膜より分離培養した平滑筋細胞と牛肺動脈内皮細胞由来の培養細胞に対し、ラット腹水より得た好中球のリソソーム画分を作用させ、増殖傾向をトリチウムチミジン（³HTdR）の取込みおよび細胞数の変化で追求した。

その結果、1) PLFは平滑筋細胞に対しては、細胞数の多少に関わらずPLF投与量依存性の³HTdRの取込みの亢進を示した。この細胞増殖促進作用は、細胞数が少ない場合にはPLF投与後ただちに、細胞数の多い場合には一定時間後出現した。細胞数計測では、PLFは培養早期では細胞数の増加促進を示さなかったが、日数の経つに従って細胞増殖促進を示した。2) PLFは内皮細胞に対しては、細胞数の少ない、培養早期の場合にのみPLF投与量依存性の³HTdR取込みの増加および細胞数増加促進傾向を示した。しかし、内皮細胞がconfluentの状態では³HTdRの取込みは減少の傾向を示した。

これらの結果は、好中球リソソーム画分が血管平滑筋細胞および内皮細胞に対する増殖因子を持つことを示している。本研究は、したがって、増殖性肥厚を伴う血管病変の成立における好中球の関与を示すものであり、血管変化の機序についての重要な情報を与えるものであり、学位論文に値するものである。